

# Estudio serológico de arbovirus en población expuesta en municipios de riesgo en Tabasco, México

Silvia M. G. Garrido-Pérez,<sup>(1)</sup> Alma S. Beltrán-Moha,<sup>(2)</sup> Olga E. Piña-Gutierrez,<sup>(3)</sup> Enrique Hernández-Martínez<sup>(4)</sup>

garridosilvia\_2000@salud.gob.mx

## RESUMEN

**OBJETIVO:** Identificar la presencia de arbovirus en sueros de población expuesta en zonas de alto riesgo, en los municipios de Centro, Comalcalco, Centla y Nacajuca, Tabasco.

**MÉTODOS:** Se realizó un estudio transversal, de una selección de sueros humanos, obtenidos por conveniencia, durante Julio y Agosto de 2003. Se integró la muestra, de acuerdo a la incidencia de los casos de aves infectadas, considerando una distribución proporcional. Se analizaron n=18 muestras, con la finalidad de estandarizar la técnica de diagnóstico de especies arbovirales en la región, por dos observadores. Se realizó análisis estadístico descriptivo de los datos a partir del análisis cualitativo, por positividad a imagen fotográfica del VON proporcionada, comparándola con las imágenes de los resultados de las muestras obtenidas y fotografiadas en nuestro laboratorio. Se obtuvo la concordancia aleatoria y su corrección a través del índice de variabilidad interobservador de Kappa.

**RESULTADOS:** En los sueros analizados, se observó que el total de la muestra fue negativa para la fijación de anticuerpos IgM. Para la fijación de anticuerpos IgG, se observó reactividad para arbovirus en el 61.0% de los sueros, con imagen al microscopio similar a la proporcionada para VON (n=8) y Virus de Dengue (n=3). Se obtuvo un índice de variabilidad interobservador de Kappa= 0.77.

**DISCUSIÓN:** A pesar de que son pocos los laboratorios que realizan esta técnica diagnóstica presuntiva, la prueba cuenta con una buena confiabilidad, dado los resultados de aplicaciones previas en otras poblaciones, por lo que consideramos el Kappa obtenido en nuestro estudio confiable; el hecho, de que el total de los sueros fueron no reactivos a la IgM, sólo representa la fase clínica en la que se encontraban algunos individuos durante la toma de la muestra, y a aquellos sujetos libres de infección arboviral, considerando el hecho de la reactividad en mas del 50% de los sueros a la IgG la cual se sabe es de memoria

inmunológica. Sin embargo, el ser una técnica de tamizaje, la hace una de las pruebas presuntivas importantes, para identificar a las especies arbovirales, que puedan circular en nuestro estado, factible de ser confirmada.

**CONCLUSIÓN:** Dado las implicaciones e impacto de los resultados sobre la salud de la población, consideramos la pertinencia del envío de los sueros analizados al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas (InDRE), para su confirmación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como un estándar de oro, por la posibilidad de la presencia de reacciones cruzadas con otras especies de arbovirus.

Lo anterior, nos proporcionará la información necesaria para conocer la sensibilidad, especificidad, así como los valores predictivos positivos y negativos de la prueba, en la muestra analizada, y tal vez determinar la confiabilidad y validez de la misma.

**Palabras claves:** *Arbovirus, Índice de variabilidad interobservador, Kappa, Técnica Arbovirus Screen NON USA, Virus del Oeste del Nilo.*

## SUMMARY

**OBJECTIVE:** To identify the presence of arbovirus in serum of population exposed in zones of high risk, in the municipalities of Center, Comalcalco, Centla and Nacajuca, Tabasco.

**METHODS:** A study was carried out transversal, of a selection of serum, obtained by convenience, during July and August of 2003. The sample was integrated, according to the incidence of the cases of fowls infected, considering a proportional distribution. They were analyzed n = 18 samples, with the purpose of standardize the species Diagnosis Technique arboviruses in the region, for two observatories. Descriptive statistical analysis of the data as of the qualitative analysis was carried out, by positively to photographic image of the West Nile Virus (WNV), provided

<sup>(1)</sup> Jefa de la oficina de Investigación del laboratorio de Salud Pública. Secretaría de Salud del Estado de Tabasco.

<sup>(2)</sup> Responsable del laboratorio de Parasitología.

<sup>(3)</sup> Directora del laboratorio Estatal de Salud Pública

<sup>(4)</sup> Subsecretario de Salud del Estado de Tabasco.

by the supplier, comparing it with the images of the results of the samples obtained and photographed in our laboratory. The agreement was obtained random and its correction through the index of variability interobservador of Kappa. RESULTS: Of the serum analyzed (n = 18), was observed that the total of the sample went negative for the fixing of antibodies IgM. For the fixing of antibodies IgG, was observed reactivity for arbovirus in the 61.0% of the serum, with image to the similar microscope to it provided for West Nile Virus (n = 8) and virus of Dengue (n = 3). An index was obtained of variability meanwhile observant of Kappa = 0.77. DISCUSSION: In spite of that they are few the laboratories that carry out this technical diagnostic one presumptive, the test counts on a high one confiability, given the prior results of applications in other populations, for which we consider the Kappa obtained in our dependable study, in spite of the size of the sample, since the most minimum variation meanwhile observant is used to deviating the estimation toward the left. The fact, that the total of the serum went not reactive to the IgM, only represents the clinical phase in which some individuals during it were found takes of the sample, and to those free subjects of infection arboviral, considering the fact of the reactivity in but of the 50% of the serum to the IgG, which is known is by memory immunology. However, by being a technique of tamizaje, we consider it as one of the tests presumptive important, to identify to the species arbovirales, that they be able to circulate in our State.

CONCLUSIONS: Given the implications and impact of our results upon the health of the population, we consider the relevance of the sent of the serum analyzed to the Instituto Nacional de Diagnostico y Referencias Epidemiológicas (INDRE), for its confirmation by Polymerase Chain Reaction (PCR), as a gold standard. The previous thing, the necessary information will provide us to know the sensibility, specificity as well as the values predictivos positive and negative of the test, in the sample analyzed, and perhaps to determine the confiability and validity of the same one.

**Keywords:** *Arbovirus, Index of variability meanwhile observant, Kappa, Technical Arbovirus Screen NON USA, West Nile Virus.*

## INTRODUCCIÓN

La Infección humana por el Virus del Oeste del Nilo (VON) en el hemisferio Occidental, se conoce desde la infección observada en Nueva York, en Agosto de 1999, donde ocurrió la muerte masiva de cuervos americanos y otras aves silvestres, así como otras especies del zoológico del Bronx.<sup>1,2</sup> Durante este periodo, se comprobó, que las aves son hospederos introductorias del virus, y aquellas con patrones migratorios fungen como agentes críticos replicadores en brotes del VON. También se observó la presencia del virus

en humanos, que desarrollaron los cuadros clínicos de Meningitis y Encefalitis, que generalmente se presentan cuando la instalación de la enfermedad es agresiva; además de una elevada mortalidad en ciertas aves domésticas y silvestres, equinos y otros animales mamíferos.<sup>3,4</sup>

Identificado el agente causal, y el panorama general de la relación entre el VON y las aves que potencialmente lo hospedan, se describieron los grupos de aves en los que se ha detectado el virus con mayor frecuencia; tratando de establecer una explicación del fenómeno, a través de la migración de las aves, como un posible medio de dispersión.<sup>5</sup> El VON, es un arbovirus asociado a artrópodos, que se distribuyen por los trópicos del mundo, causando la enfermedad a humanos y animales. En América se encuentran ocho familias de arbovirus que representan a 145 tipos distintos de especies, de estos virus, los de importancia en nuestra región son los de la familia de los togavirus, y de estos el género de los flavivirus, representados por el virus del Dengue, virus de la Encefalitis Equina de San Luis y el Virus del Oeste del Nilo. Así, los vectores mecánicos en la transmisión propagativa y mantenimiento del arbovirus inician con la ingesta de sangre contaminada para infectar la vía digestiva, entrando al hemócele y transportándose a glándulas salivales y tejido ovárico, estableciéndose la transmisión transgeneracional del virus al huevo en desarrollo.<sup>6-8</sup>

Los vectores, sobreviven en varios ecosistemas (bosque tropical principalmente), en zonas con densidades bajas de población hospedera, donde se encuentra la infección en vectores artrópodos hematófagos, lo que incrementa la probabilidad de transmisión del virus del vector a los vertebrados.<sup>9</sup>

La infección en vertebrados se caracteriza por hospedar al virus sólo por corto tiempo. El vector infecta mientras se alimenta de ellos; por lo que la viremia, es causada por artrópodos capaces de infectar al alimentarse. El hospedero responde con interferón y anticuerpos (infección viral eliminada), quedando así inmune de por vida.<sup>10-12</sup>

La infección por VON en territorio Mexicano, se observó durante el año 2002, en los estados de Coahuila y Tamaulipas, en dos personas mexicanas procedentes de E.U.A., que se infectaron en Texas y New York. Uno de estos casos falleció el 20 de Agosto del mismo año, por lo que se considera esta fecha como oficial para la entrada del virus a nuestro país.

En Tabasco, durante el 2003, se observó la muerte de un cuervo en el Parque Ecológico Yumká, por lo que se realizó aislamiento viral, realizado por inoculación en ratón lactante y prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR), identificando el VON, por la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales e Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas.<sup>1</sup>

Inmediatamente se realizó un operativo, implementando un cerco epidemiológico, en el que se obtuvieron 144 muestras

de humanos, de las cuales 108 fueron del Parque Yumká, su zona de Influencia y la colonia Prados de Villahermosa.

Los hospitales realizaron el envío de 10 sueros de pacientes con sintomatología compatible con definición operacional de caso probable a VON.<sup>2</sup> Así mismo, las brigadas de vectores obtuvieron un total de 134 muestras de sueros de aves de varias localidades. Después de ser analizados, sólo 11 fueron positivos; obteniendo una seropositividad al VON del 8.2%.

De acuerdo al impacto de la enfermedad en humanos (E.U.A), aves y otros animales, y el antecedente de VON circulando en nuestro territorio, fue necesario muestrear a las personas que radicarán en las áreas de exposición a aves y animales seropositivos, para realizar la identificación de aquellas con síntomas sugestivos de caso de síndrome febril compatible con VON, para la comprobación positiva o negativa a fijación de IgM e IgG (memoria inmunológica).

La circulación en territorio tabasqueño del VON, comprobada por serología en las muestras de aves capturadas y equinos, nos obligó a buscar alternativas diagnósticas descentralizadas, con la finalidad de contribuir a su rápida detección, utilizando Inmunofluorescencia Indirecta, para él diagnóstico en suero de arbovirus por fijación de anticuerpos IgM e IgG, con la metodología propuesta por los laboratorios PANBIO. Técnica utilizada en Nuevo León, con resultados confiables, que han sido verificados por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC-Atlanta).<sup>13</sup> Realizar el estudio serológico a muestras tomadas selectivamente nos permitirá identificar el virus oportunamente, derivando en acciones preventivas específicas, además de iniciar el estudio serológico del VON, en el Laboratorio de Salud Pública de Tabasco.

## OBJETIVO

Identificar la presencia de arbovirus en sueros de población expuesta en zonas de alto riesgo, en municipios de Tabasco.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, observacional, descriptivo de una selección de sueros, obtenidos por conveniencia, durante Julio y Agosto de 2002. Se analizaron 18 muestras, para igual número de reactivos, dispuestos para estandarizar la técnica de diagnóstico del VON en la región. Se ubicó la mayor proporción de la muestra, de acuerdo a la incidencia de los casos en aves infectadas, considerando una distribución proporcional y el resto por conveniencia, hasta integrar la totalidad de la muestra. (Tabla 1).

La selección de sueros de los trabajadores del Parque Ecológico Yumká, se obtuvo a partir de un listado, considerando la sintomatología y el grado de exposición

descrito en la historia clínica, de la submuestra obtenida, se realizó un muestreo aleatorio simple sin reemplazo hasta completar la proporción de la muestra solicitada.

La selección de la muestra, proveniente de la Quinta Grijalva, se eligió de acuerdo a la exposición del personal y de la

**TABLA 1:** Selección de muestra de sueros de personas, según incidencia de casos de aves infectadas.

UBICACIÓN	MUNICIPIO	PERSONAS
YUMKA	CENTRO	7
QUINTA GRIJALVA	CENTRO	3
PRADOS DE VILLAHERMOSA	CENTRO	2
BARRANCA Y AMATE	CENTRO	2
COMALCALCO	COMALCALCO	2
CENTLA	CENTLA	1
NACAJUCA	NACAJUCA	1
<b>TOTAL</b>	<b>4</b>	<b>18</b>

**Fuente:** Registro de muestras del L.E.S.P.

presencia de antecedentes de enfermedad compatible con definición de caso probable por VON.

La muestra de la Colonia Prados de Villahermosa, Ranchería Barranca y Amate 3ra. Sección, municipios de Comalcalco y Nacajuca, se tomaron del banco de sueros, considerando específicamente, los sueros a los que no se les realizó un análisis previo, así como aquellos analizados previamente.

La muestra considerada para el municipio de Centla, se ubicó geográficamente en los Pantanos (Reserva de la Biosfera), obteniendo sueros de los trabajadores que se encontraron expuestos a las actividades en campo. La transportación de los sueros se hizo en termos entre los 2 °C y 8 °C.

Para la identificación de arbovirus, se utilizó la prueba de Diagnostico presuntiva: Screening Arbovirus NO USA, Técnica de Inmunofluorescencia (fijación de anticuerpos IgM e IgG infectados). Es capaz de identificar diferentes especies de arbovirus como el Oeste del Nilo, Encefalitis Equina Venezolana, Encefalitis de San Luis, Fiebre Amarilla y Dengue. Cuenta con una sensibilidad y especificidad superior al 90.0%, una confiabilidad del 95.0% y una tasa de falsos positivos de aproximadamente 6:0%.<sup>14-17</sup>

Una vez recibido el Kit de reactivos, se tomaron las muestras de sangre total y se separaron los sueros, siguiendo la técnica propuesta por los Laboratorios PANBIO<sup>18</sup> (Anexo 1 y diagrama 1). La lectura se realizó dentro de las 24 horas de la separación del suero.

Para la lectura e interpretación de las exposiciones, se utilizó el método cualitativo por observación interobservador, determinando la seropositividad a imagen fotográfica comparativa (Fig. 1), realizándola dos analistas ciegos uno con respecto al otro; considerándose cada lectura como muestra independiente y la exactitud de las mediciones realizadas, clasificando los sueros bajo estudio de acuerdo a si tenían o no la característica a identificar.

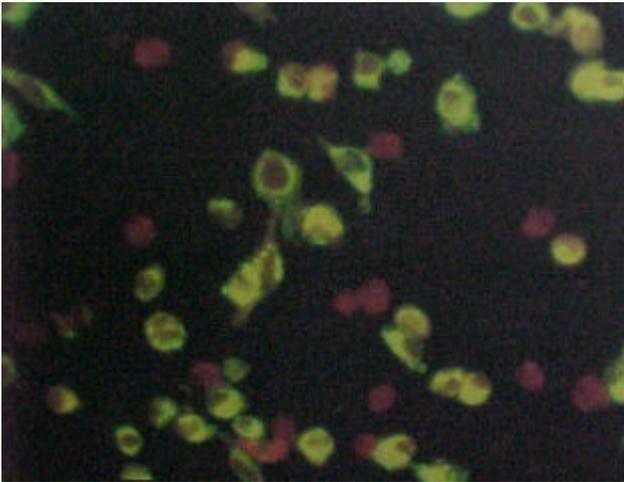


FIGURA 1. Fotografía estándar del proveedor.

Se realizó el análisis de los datos, utilizando estadística descriptiva, el porcentaje de concordancia entre las dos clasificaciones binarias, dada la posible concordancia aleatoria substancial exenta de tendencias sistemáticas de clasificación similar de las mediciones por los observadores y el índice de la calidad de las mediciones para características binarias como indicador de confiabilidad, ya que se consideró la posible variación de la calidad de las mediciones y la posible independencia de los errores, para las mediciones pareadas a partir de las cuales se calculó Kappa, con la finalidad de corregir la concordancia aleatoria esperada observada, entre las mediciones pareadas. Se utilizó el programa Excel y el paquete estadístico Stata 6.0.<sup>19-22</sup>

**RESULTADOS**

En los sueros analizados (n = 18) con el microscopio de Inmunofluorescencia, se observó por imagen comparada con fotografía del proveedor (Imagen 1), que el total de las muestras fueron seronegativas para la fijación del antígeno IgM. (Fig. 2).

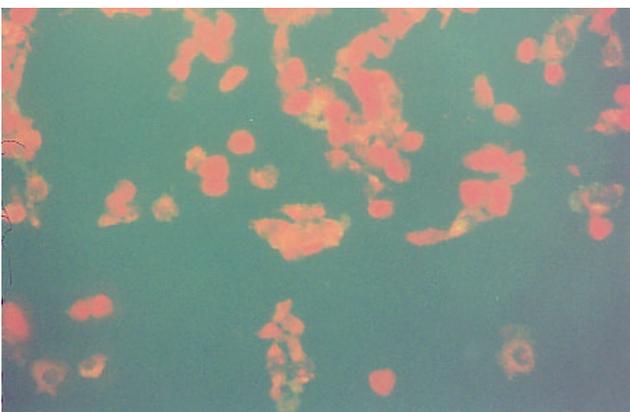


FIGURA 2. Células normales

En cuanto al antígeno IgG, se observó reactividad seropositiva para especies arbovirales en el 61.0 % (n = 11) de la muestra analizada (Graf. 1). En esta muestra de sueros, se identificó microscópicamente imagen similar a la proporcionada para VON y Virus de Dengue (Imagen 3 y 4) en el 44.4 % (n = 8) y 16.6 % (n = 3) respectivamente (Graf. 2 y Tabla 2).

El porcentaje de concordancia aleatoria observada fue del 89.0 %, la corrección a través del coeficiente de Kappa, fue de 0.77.

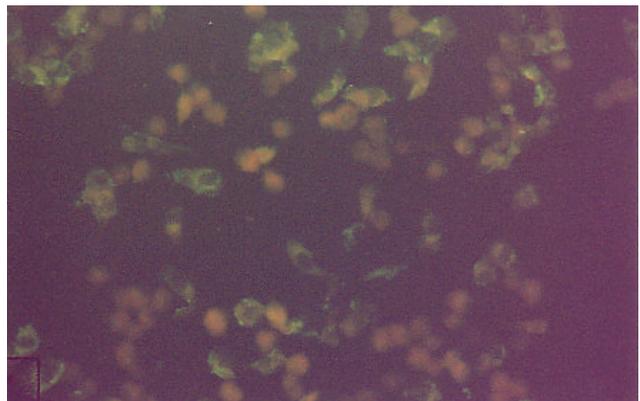


FIGURA 3. Tabasco VON

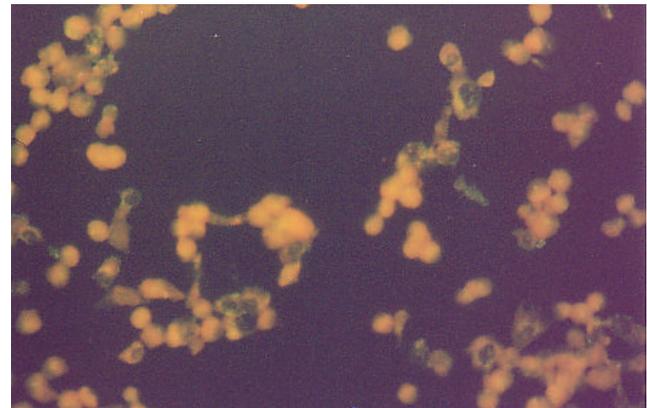
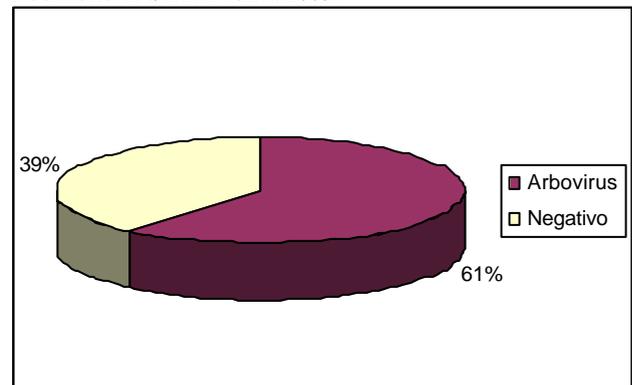


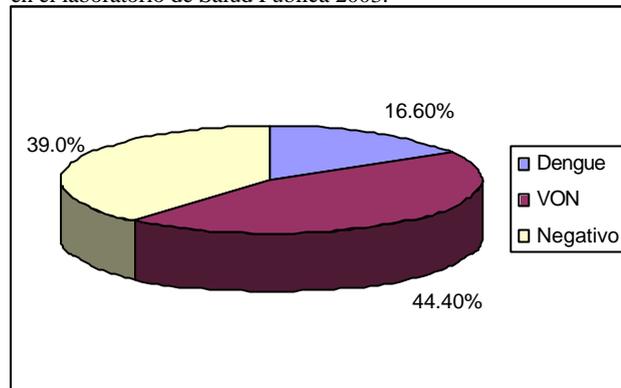
FIGURA 4. Tabasco dengue

**GRÁFICA 1:** Frecuencia de arbovirus en sueros analizados, laboratorio de Salud Pública 2003.



Fuente: Registros de laboratorio de Salud Pública 2003.

**GRÁFICA 2:** Frecuencia de especies arbovirales en sueros analizados en el laboratorio de Salud Pública 2003.



Fuente: Registros de laboratorio de Salud Pública 2003.

**TABLA 2:** Porcentaje de arbovirus en sueros analizados por ubicación geográfica.

UBICACIÓN	No. SUEROS	DENGUE	VON	NEG
YUMKA	7	0	4	3
QUINTA GRIJALVA	3	3	0	0
PRADOS DE VILLAHERMOSA	2	0	2	0
BARRANCA Y AMATE	2	0	0	2
COMALCALCO	2	0	2	0
CENTLA	1	0	0	1
NACAJUCA	1	0	0	1
TOTAL	18	3	8	7
%	100.0	16.6	44.4	39.0

Fuente: Registro del laboratorio de Salud Pública 2003.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, son de gran importancia, pues a pesar de que son pocos los laboratorios que realizan esta técnica diagnóstica de tamizaje, la prueba cuenta con una alta confiabilidad, dado los resultados de aplicaciones previas en otras poblaciones, por lo que consideramos que el Kappa obtenido en nuestro estudio es confiable, a pesar del tamaño de la muestra, ya que la mínima variación interobservador suele desviar la estimación hacia la izquierda en general, pero en particular sucedió en nuestro estudio, ya que la diferencia interobservador de sólo una observación afectó el Kappa, sin embargo la confiabilidad en general es buena. El hecho, de que el total de los sueros analizados fueron no reactivos a la IgM, sólo demostró la fase clínica en la que se encontraban algunos individuos durante la toma de la muestra, y a aquellos sujetos libres de infección arboviral, considerando el hecho de la reactividad a la IgG, la cual se sabe es de memoria inmunológica. Sin embargo, por ser una técnica de tamizaje, la consideramos como una de las pruebas presuntivas importantes, para identificar a las especies arbovirales, que circulan en nuestro Estado, muy a pesar de las posibles reacciones cruzadas que puedan presentarse.

## CONCLUSIÓN

Dado las implicaciones e impacto de nuestros resultados sobre la salud de la población, consideramos la pertinencia del envío de los sueros analizados al INDRE, para su confirmación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como un estándar de oro.

Lo anterior, nos proporcionará la información necesaria para conocer la sensibilidad, especificidad, así como los valores predictivos positivos y negativos de la prueba, en la muestra analizada, y tal vez determinar la confiabilidad y validez de la misma.

## REFERENCIAS

1. Komar N. West Nile viral encephalitis. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2000, 19(1), 166-176.
2. Komar N., Panella NA., Burns JE., Dusza SW., Mascarenhas TM. y Talbot TO. Serologic Evidence for West Nile Virus Infection in Birds in the New York City Vicinity During an Outbreak in 1999. Emerging Infectious Diseases, Vol. 7, No. 4, July-August 2001, 621-625.
3. Ubicación Update: West Nile Virus Activity – Northeastern United States January- August 7, 2000.
4. CDC MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report August 11, 2000 / Vol. 49 / No. 31, p.p. 714 – 717.
5. Control: CDC MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report West Nile Virus activity – New York and New Jersey, 2000. July 21, 2000 / Vol. 49 / No. 28 p.p. 641-642.
6. Aves y el Virus del Nilo. Documentos y archivos oficiales del primer Taller de VON, 2002. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencias Epidemiológicas. Ponentes: M. en C. Fanny Rebón, Museo de Zoología, Facultad de Ciencias de la UNAM y Dr. José Luis Alcántara, del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. México.
7. Update : West Nile Virus Activity- Eastern United States, 2000. CDC MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. November 24, 2000/ vol. 49 / No. 46 pp: 1044-1047
8. West Nile Virus Activity – Eastern United States, 2001. CDC MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. July 27, 2001 / Vol. 50 / No. 29 p.p. 617-619.
9. Human West Nile Virus Surveillance – Connecticut, New Jersey And New York 2000.
10. CDC Center for Disease Control and Prevention West Nile Virus (WNV) Infection Informatior for Clinicals
11. CDC: Center for Disease Control and Prevention. Safer. Healthier. People <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/index.html>, [http://www.cindi.usgs.gov/hazard/event/westnile/west\\_nile.html](http://www.cindi.usgs.gov/hazard/event/westnile/west_nile.html)
12. CDC MMWR Morbidity and Mortality Weekly report West Nile Virus Activity – United States, October 17-23, 2002. Vol. 51 / No. 42 octubre 25, 2002, p.p. 951
13. Arbovirus IFA Slides: for the detection of antibodies to

arbovirus species, for laboratory and veterinary use only. Specificity WNV #4086-01-12. PANBIO, Inc. 9075 Guilford Road, Columbia, MD 21046, USA.

14. McCormick, J.B. 1988. Arboviruses. p. 842-847. In, Joklik, W. K., H.P. Willett, D.B. Amos, and C.M. Wilfert (ed.), Zinsser Microbiology, 19th ed.

15. Centers for Disease Control and Prevention. 1998. Arboviral infections of the central nervous system – United States, 1996, 1997. Morbid. Mortal. Wkly. Rep. 47:517-522.

16. Monath, T.P., and T. F. Tsai. 1997. Flaviviruses. p. 1133-1185. In Richman, D.D., R. J. Whitley, and F. G. Hayden (ed.), Clinical virology. New York: Churchill Livingstone.

17. Monath, T.P., and T. F. Tsai. 1997. Flaviviruses. p. 1217-1255. In Richman, D.D., R. J. Whitley, and F. G. Hayden (ed.), Clinical virology. New York: Churchill Livingstone. PI-

ArboIFA-04DEC02-005.

18. Replicación: Update: West Nile Virus Activity-Northeastern United States, 2000, CDC MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. September 15, 2000/vol. 49/No.36 p.p 820-822.

19. Stata Corporation. Stata Reference Manual: Release 3.1. 6a. edición. Texas: College Station, 1993.

20. Stata User's Guide. Release 6, Stata Press College Station, Texas.

21. Stata Reference Manual Release 6, Volumen 1 A-G, Epitables for Epidemiologists, pp:366-414. Stata Press College Station, Texas.

22. Stata Corporation 702 University Drive East College Station, Texas 77840 USA, Internet: <http://www.stata.com>, [stata@stata.com](mailto:stata@stata.com).

### ANEXO 1

#### DIAGNÓSTICO DE IgM e IgG VS arbovirus Screening arbovirus no usa técnica de inmunofluorescencia<sup>3</sup>

1. Diluir los sueros problemas y controles 1:40 con buffer PBS pH 7.4 (10 microlitros de suero + 390 microlitros de PBS para el suero problema y 5 microlitros + 195 microlitros de PBS para los controles).

2. Añadir de 20-25 microlitros de la dilución a cada pozo.

- a) West Nile
- b) Encefalitis equina venezolana
- c) Encefalitis de San Luis
- d) Fiebre amarilla
- e) Control positivo dengue
- f) Control negativo arbovirus

3. Incubar en cámara húmeda protegido de la luz 45 minutos a 37°C para IgM y 30 minutos a temperatura ambiente para IgG.

4. Enjuagar con PBS.

5. Dejar 5 minutos en PBS, sacar y dejar nuevamente 5 minutos en PBS nuevo.

6. Enjuagar con PBS y no secar.

7. Añadir 25 microlitros de conjugado IgM o IgG según el diagnóstico a cada pozo.

8. Incubar en cámara húmeda protegido de la luz 45 minutos a 37°C para IgM y 30 minutos a temperatura ambiente para IgG.

9. Enjuagar con PBS.

10. Dejar 5 minutos en PBS, sacar y dejar nuevamente 5 minutos en PBS nuevo.

11. Enjuagar con PBS y secar al aire.

12. Montar con glicerol al 70% en PBS PH 7.5-8.9 (70 mililitros de glicerol + 30 mililitros de PBS).

13. Leer en microscopio de epifluorescencia a 40x-100x.

14. Llenar bitácora de proceso.

**NOTA:** Se procesan 2 muestras por cada laminilla, en cada una se le colocan sus controles.

Muestra 1 del pozo 1 al 6, y muestra 2 del pozo 7 al 12; Pozos 6 y 8 son controles positivos; Pozos 6 y 7 son controles negativos.

Diagnóstico de IgM e IgG Vs arbovirus screening no usa técnica de inmunofluorescencia.

